Münster 1937 No 135 Med DiSS

Aus dem Hygienischen Institut
der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster / Westf.
Direktor: Prof. Dr. K. W. Jötten.

Untersuchungen über Züchtung von Tuberkelbazillen auf flüssigen Nährböden.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität zu
Münster / Westf.

vorgelegt von:

Arnold Schlömer
aus Münster / Westf.

Buch- und Kunstdruckerei Wilh. Postberg, Bottrop i. W.

1936.

Nicht in gleicher Weise hat sich die Züchtungsmethode des Tuberkelbazillus unter Verwendung von flüssigen Nährböden entwickelt.

Man muß hier unterscheiden:

1. Die Züchtung an der Oberfläche der Nährflüssigkeit,
2. die Züchtung in der Tiefe der Nährflüssigkeit.

Die Kultur des Tuberkelbazillus an der Oberfläche ist wiederum von Robert Koch ausgearbeitet worden, aber diese Methode hat nur ihren bestimmten Anwendungsbereich, und sie dient in erster Linie der Bereitung der Tuberkuline. Ferner benutzt man sie da, wo es auf die Gewinnung größerer Tuberkelbazillen ankommt, als Ausgangspunkt für die Herstellung spezifischer Präparate. Als Nährflüssigkeit für die Oberflächenkultur verwendet man Glyzerinbouillon und synthetische Nährflüssigkeiten. Nun ist die Methode der Oberflächenzüchtung nicht für alle Versuche geeignet. Besonders ungünstig ist sie für Reihenversuche, da die häufigen Kontrollen Wachstumsstörungen bedingen und dadurch die Versuchsgenauigkeit beeinträchtigen können. Zu diesen Zwekken kommt vielmehr die Methode der Kultur des Tuberkelbazillus in der Tiefe besonders geeigneter Nährflüssigkeiten in Frage. Die Beobachtungen, daß der Tuberkelbazillus auch in der Tiefe der Nährflüssigkeit wächst, stellte Koch schon im Jahre 1884 an. Er berichtet über einen feinkörnigen, sandartigen aus Tuberkelbazillen bestehenden Bodenbelag in Kulturen von neutralisiertem Fleischwasser in Erlemeyer-Kolben. Norcard und Roux beschreiben 1887 ähnliches für die Kalbsbouillon. Bei Untersuchungen über die Tauglichkeit fester und flüssiger pflanzlicher Nährböden stellt auch 1893 Sander fest, daß der Tuberkelbazillus in der Tiefe zu wachsen vermag. Es handelt sich bei diesen Züchtungsversuchen um Kartoffelwasser mit 4 % Glyzerinzusatz und Kartoffelbouillon. 1909 machte Miehe die gleichen Beobachtungen. Andere Forscher gaben nun Nährflüssigkeiten, die ein Tiefenwachstum der Tuberkelbazillen zulassen, an. So nennt Kirchner drei Flüssigkeiten, die für das Tiefenwachstum besonders geeignet sind. Die von Kirchner hergestellten Nährflüssigkeiten basieren auf den Versuchen der oben angegebenen Forscher.

Die Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, zu untersuchen, wie sich die Wachstumsunterschiede der drei Nährflüssigkeiten untereinander verhalten, und welche Vorteile die flüssigen Nährböden gegenüber den festen bei der Gewinnung von Tuberkelbazillen besitzen. Die Zusammensetzung der Kirchnerschen Nährflüssigkeiten ist folgende:

1. Synthetische Nährflüssigkeit mit 10% Serum (Sy-Ser).

   Sie setzt sich zusammen aus:

a) Dinatriumphosphat	3,0	g
b) Monokaliumphosphat	4,0	g
c) Magnesiumsulfat	0,6	g
d) Natriumcitrat	2,5	g
e) Asparagin	5,0	g
f) Glyzerin	20	ccm
g) Aqua dest.	1000	ccm

2. Mineralsalzlösung mit 10% Serum (Min-Ser).

   Sie enthält:

a) Natriumphosphat	3,0	g
b) Magnesiumsulfat	0,6	g
c) Monokaliumphosphat	4,0	g
d) Natriumcitrat	2,5	g
e) Aqua dest.	1000	ccm

3. Mineralsalz-Asparaginlösung mit 10% Serum (Minas-Ser).

a) Dinatriumphosphat	3,0	g
b) Monokaliumphosphat	4,0	g
c) Magnesiumsulfat	0,6	g
d) Natriumcitrat	2,5	g
e) Asparagin	0,5	g
f) Aqua dest.	1000	ccm

Die Min-Ser-Lösung unterscheidet sich von der Syn-Ser-Lösung durch das Fehlen von Asparagin und Glyzerin. Die Mineralsalzlösung enthält keinen organischen Nährstoff. Die unter 3 angegebene Nährflüssigkeit nimmt eine Mittelstellung zwischen der unter 1 angegebenen synthetischen Nährflüssigkeit und der unter 2 als Mineralsalzlösung bezeichneten Nährflüssigkeit. Sie enthält zwar Asparagin, aber kein Glyzerin.

Die Nährflüssigkeiten werden in abgemessenen Mengen zur Aufbewahrung in Kolben gefüllt und steril vorrätig gehalten. Kirchner gibt folgende Abmessungen an: 90 ccm, 180 ccm, 450 ccm und bei Gebrauch als entsprechende Serumzusatzmengen: 10 ccm, 20 ccm und 50 ccm. Unter sterilen Vorsichtsmaßregeln werden die Flüssigkeiten bei Gebrauch in Mengen von 6 ccm in Röhrchen gefüllt. Anschließend werden die Röhrchen 48 Stunden zur Kontrolle der Sterilität in den Brutschrank gebracht. Etwaige Verunreinigungen sind dann sofort festzustellen, denn es tritt eine Trübung der vorher klaren Nährflüssigkeit auf.

Es wurde zu unseren Versuchen Serum von Menschenblut verwandt. Es besteht allerdings auch die Verwendungsmöglichkeit von Kaninchen- oder Rinderserum, zumal das erstere ohne Schwierigkeiten steril zu gewinnen ist. Das steril vom Blutkuchen abgegossene Serum wird bis zum Gebrauch im Eisschrank aufbewahrt. Kirchner empfiehlt eine Mischung von drei Seren herzustellen. Vor dem Zusatz zu den oben angegebenen Nährflüssigkeiten ist eine halbstündige Erhitzung des Serums auf 62 Grad vorzunehmen, eine Vorsichtsmaßregel, die nicht unbedingt nötig ist, da Kirchner bei seinen Versuchen bei Zusatz von mehreren hundert nicht erhitzten Seren kein Wachsen von Tuberkelbazillen feststellen konnte. Normale Seren besitzen kein bakterizides Vermögen gegenüber den Bazillen.

Die Nährböden sind ohne Bodensatz und, wie schon erwähnt, vollkommen klar. Bei flüssigem Material wird die Impfung mit der Kapillarpipette, bei festen mit der Oese vorgenommen. Auch hierbei ist auf steriles Arbeiten zu achten. Nach Beimpfung werden die Röhrchen durch Paraffin luftdicht verschlossen, um ein Austrocknen im Brutschrank zu verhindern.

Dem Min-Ser fehlt der organische Nährstoff. Dem Minas-Ser ist Asparagin, dem Syn-Ser ist Asparagin und Glyzerin zugesetzt. Kirchner fand nun, daß gerade diese Stoffe auf die Zeit des Wachstums der Tuberkelbazillen einwirkten. Er fand dabei folgende drei Verschiedenheiten:

1. Bei Syn-Ser beginnt das Tiefenwachstum rasch und schreitet schnell fort. Es besteht große Neigung zu sekundärem Oberflächenwachstum.
2. Das Minas-Ser steht im Tiefenwachstum hinter dem Syn-Ser nicht zurück, nur die Neigung zum sekundären Oberflächenwachstum kommt langsamer zustande, ferner ist das Wachstum spärlicher.

Diese drei Nährflüssigkeiten wurden benutzt, um aus dem von Phtisikern ausgeworfenen Sputum Tuberkelbazillen zu züchten. Robert Koch hat schon auf die Schwierigkeiten hingewiesen, Tuberkelbazillen direkt aus dem Sputum zu züchten, da die Begleitbakterien bedeutend schneller wachsen. Sie müssen daher vorher ausgewaschen werden. Jedes Sputum wurde vor der Bearbeitung mikroskopisch auf Tuberkelbazillen untersucht. Als Methode für die Auswaschung der Begleitbakterien wurde die nach Hohn angewandt. Die Sputen wurden in sogenannte Schüttelröhrchen mit einer Länge von 22 ccm und einem eingeschliffenen Glasstöpfel gebracht und mit 10 ccm 10%iger Schwefelsäure überschüttet. Dabei ist es ganz gleich, ob es sich um viel oder wenig Sputum handelt. Die Röhrchen werden geschüttelt, und das Material bildet mit der Schwefelsäure eine feine Emulsion. Daß die Tuberkelbazillen gegen 10%ige oder sogar 15%ige Schwefelsäure oder Natronlauge resistent sind, wurde von Löwenstein zuerst beobachtet. Die Einwirkungsdauer der Schwefelsäure auf die Tuberkelbazillen beträgt 20 Minuten, und während dieser Zeit werden die Schüttelröhrchen horizontal hingelegt, damit eine möglichst starke Vermischung mit dem Sputum stattfindet, und die Schwefelsäure so auf alle Teile einwirken kann. Dann wird 5 Minuten scharf zentrifugiert, und das Sediment mit der Platinöse unmittelbar in die Nährflüssigkeiten und auf die festen Nährböden gebracht. Eine Auswaschung mit physiologischer

Kochsalzlösung zur Neutralisation des Sedimentes wurde nicht vorgenommen und ist auch nicht erforderlich. Da die Schwefelsäure koagulierend auf den Schleim des Sputums wirkt, entstanden verschiedene Arten Sedimente. Die einen waren salbenartig, die anderen gelatinös. In allen Fällen wurde jedoch die Impfung mit der Oese vorgenommen.

Als Vergleichsnährböden zu den oben angegebenen Nährflüssigkeiten wurden der von Löwenstein und der von Petragnani gewählt.

Die Röhrchen wurden zuparaffiniert und in den Brutschrank gestellt. Eine tägliche Kontrolle der Röhrchen ist durchgeführt worden, und als positiv wurden diejenigen bezeichnet, bei denen ein sandkornartiger, grauweißer Bodenbelag deutlich sichtbar war. Außerdem wurden von jedem Röhrchen mikroskopische Präparate (Färbung nach Ziehl-Neelson) angefertigt. Die Zeit des Wachstums war außerordentlich verschieden. Sie schwankte zwischen 7 Tagen und 4—6 Wochen. Es wurden insgesamt 191 Sputen auf die drei flüssigen Kirchnerschen und die beiden Vergleichs-Nährböden verimpft.

Durch Verunreinigung fielen jedoch mehrere aus. Die Verunreinigungen wurden in den meisten Fällen durch Heubazillen hervorgerufen. Bei den Nährflüssigkeiten ist die Verunreinigungsgefahr bedeutend größer als bei den festen Nährböden.

Tabelle 1.

Nährflüssigkeiten und Nährböden	Verarbeitete Proben	Verunreinigungen	%
Sy-Ser	190	8	4.21
Min-Ser	190	6	3.20
Minas-Ser	189	14	7.40
Petragnani	180—	5	3.00
Löwenstein	180	5	3,00

Aus der Tabelle 1 ist zu ersehen, daß in fast 5 % der gesamten verarbeiteten Proben bei den Nährflüssigkeiten Verunreinigungen sich ergaben, während bei den festen Nährböden nur

in 0,3 % der angestellten Versuche Verunreinigungen vorkamen. Bei den Kirchnerschen Nährflüssigkeiten trat bei Verunreinigung innerhalb weniger Stunden eine Trübung auf. Bei den festen Nährböden zeigten die Kolonien die Verunreinigung.

Von den 191 Sputen ergaben sich in 12 Fällen sowohl auf den festen, wie auch auf den flüssigen Nährböden positive Ergebnisse gegenüber 32 Fällen, bei denen überhaupt kein Wachstum zu beobachten war. Wahrscheinlich handelt es sich in diesen Fällen um nicht wachstumsfähige Tuberkelbazillen.

Tabelle 2.

Von 191 Proben waren auf allen Nährböden	Zahl	%
positiv	12	6,8
negativ	32	16,8

Die Tabelle zeigt, daß von den 191 verarbeiteten Sputen auf allen Nährböden nur 6,8 % positiv waren, gegenüber 16,8 %, die auf allen Nährböden ein negatives Ergebnis zeigten.

Der Vergleich der Kirchnerschen Lösungen mit den festen Nährböden zeigte, daß die ersteren zur Zucht von Tuberkelbazillen gut geeignet sind. Um den Vergleich anstellen zu können, wurden die Fälle genommen, bei denen auf einer oder zwei Flüssigkeiten Wachstum zu sehen war, während die festen Nährböden negative Ergebnisse hatten.

Hier ergab sich, daß 36mal ein positives Ergebnis in der flüssigen Kultur erzielt wurde, während das Wachstum auf festem Nährboden negativ war. Diesem Ergebnis stehen nur drei Fälle gegenüber, bei denen lediglich die festen Nährböden positives Wachstum zeigten, während die flüssigen versagten. Prozentual ausgedrückt heißt dieses, daß in 92,5 % der Fälle die flüssigen Nährböden positiv waren gegenüber 7,5 % der Fälle auf festen Nährböden.

Um einen weiteren Vergleich der Nährflüssigkeiten untereinander und mit den festen Nährböden anstellen zu können, wurde bei der Gesamtzahl der verimpften Sputen einschließlich der verunreinigten Röhrchen die positiven und negativen Ergebnisse für alle fünf angewandten Nährböden bestimmt. Dabei zeigte es sich, daß die Syn-Ser-Lösung von allen die brauchbarste ist, denn in 68 % der Fälle konnte Wachstum festgestellt werden, gegenüber nur 28 % negativen Ergebnissen. Für die Min-Ser-Lösung ergab sich schon ein Ueberwiegen der Prozentzahl 56,6 der negativen Ergebnisse über die Prozentzahl 40,0 der positiven. Die positiven und negativen Ergebnisse der Minas-Ser-Lösung unterscheiden sich nicht allzu sehr.

Tabelle 3.

Nährböden	verarbeitete Proben	verunreinigt	%	positiv	%	negativ	%
Syn-Ser	190	8	4.2	130	68,4	52	28
Min-Ser	190	6	3,2	76	40,0	108	56,8
Minas-Ser	189	14	7,4	78	42,2	97	46
Löwenstein	180	5	3,0	52	28,9	123	68,2
Petragnani	180	5	3,0	49	27,2	126	70,0

Aus den Zahlen geht deutlich die Ueberlegenheit der Syn-Ser-Lösung gegenüber den anderen Lösungen hervor. Das Resultat für die Minas-Ser-Lösung rechtfertigt die von Kirchner angegebene Mittelstellung. Bei dem Vergleich der festen Nährböden war zahlenmäßig kein oder nur ein ganz geringer Unterschied festzustellen. Die Tabelle zeigt, daß die Kirchnerschen Flüssigkeiten zu Züchtungszwecken von Tuberkelbazillen besser geeignet sind als die festen Nährböden.

Das gleiche Ergebnis findet sich, wenn man die Fälle berücksichtigt, bei denen von den jeweils beimpften 5 Röhrchen lediglich eins positiv war, während alle anderen negativ waren. In den Fällen, wo auf einem Nährboden Wachstum beobachtet wurde, fand sich das positive Ergebnis:

Tabelle 4.

bei	Syn-Ser	23mal,
„	Myn-Ser	9 „
„	Minas-Ser	1 „
„	Petragnani	2 „
„	Löwenstein	0 „

Es traten auch Fälle ein, wo das Wachstum auf einem Röhrchen negativ, auf den übrigen 4 aber positiv war. Das negative Ergebnis war bei:

Tabelle 5.

bei	Syn-Ser	1mal,
„	Min-Ser	12 „
„	Minas-Ser	3 „
„	Petragnani	0 „
„	Löwenstein	0 „

Auch diese Zahlen lassen wieder eindeutig die Ueberlegenheit der Syn-Ser-Lösung über alle anderen angewandten Nährböden erkennen. Ferner zeigte es sich wiederum, daß die Brauchbarkeit der Nährflüssigkeiten größer ist, als die der Nährböden.

Zusammenfassung.

Zur Züchtung des Tuberkelbazillus sind verschiedene Methoden angewandt worden. Koch versuchte zuerst die pflanzlichen Nährböden, hatte damit aber nur geringen Erfolg. Dann verwandte er Rinderserum. Diesem Rinderserum wurde später von verschiedenen Forschern (Roux und Norcard) Glyzerin hinzugesetzt. Dann wurde der Einährboden von Pétroff angegeben, der heute in den verschiedensten Modifikationen (Hohn, Löwenstein, Petragnani u. a.) im Gebrauch ist. Die Züchtung unter Verwendung flüssiger Nährböden hat sich erst später entwickelt. Mit derartigen Versuchen haben sich besonders Miehe, Sander und Kirchner befaßt. Kirchner hat 3 Nährflüssigkeiten angegeben, die ein Tiefenwachstum zulassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit der flüssigen Nährböden und der Einährböden zur Zucht von Tuberkelbazillen angestellt. Als Material ist tuberkelbazillenhaltiges Sputum von Phtisikern verwandt worden. Vor der Überimpfung wurde es durch Auswaschen mit 10%iger Schwefelsäure vorbehandelt, um dadurch die Begleitbakterien abzutöten. Im ganzen wurden 190 Proben verarbeitet. Die Verunreinigungsgefahr ist bei den Nährflüssigkeiten größer als bei den festen Nährböden.

Das Wachstum von Tuberkelbazillen wurde erzielt auf den flüssigen Nährböden in 50 % der Fälle, während bei den festen Nährböden nur 28 % positiv waren. Bei einem Vergleich der flüssigen Nährböden untereinander ist die Syn-Lösung von allen die brauchbarste.

Es waren auf 1 oder 2 Nährflüssigkeiten Wachstumsvorgänge in 91 % gegenüber nur 7,4 % auf ein oder zwei positiven Ergebnissen auf den festen Nährböden zu beobachten. Dieses läßt

deutlich eine Überlegenheit der Nährflüssigkeiten gegenüber den festen Nährböden erkennen.

Es empfiehlt sich, stets bei der Züchtung von Tuberkelbazillen mehrere Nährflüssigkeiten zu verwenden, denn es ergab sich, daß oft nur auf einem der 5 Röhrchen Wachstum zu beobachten war.

Am Schlusse der Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht Herrn Professor Dr. K. W. Jötten für die freundliche Überlassung des Themas und ihm sowie Herrn Dozent Dr. med. habil. Heinz Reploh für liebenswürdige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit zu danken.

Literaturverzeichnis.

Hohn, Josef, Zentralbl. f. Bakt. 1926, Bd. 98, S. 460—467.

Koch, Robert, Mittlg. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt II Berlin, 1884, S. 17.

Kirchner, O., Zentralbl. f. Bakt. Bd. 124, S. 403.

Löwenstein, A., Wiener klin. Wo. 1925, Nr. 29, S. 510.

Pawlowsky, A. D., Z. f. Tuberkulose, Bd. 16, 1910, H. 1, S. 181.

Petragnani, G., Referat, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 92, 1929, S. 117.

Pétroff, S. A., Referat, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 63, S. 519, 1915.

Proskauer, B. u. Beck, M., Z. f. Hygiene, Bd. 18, S. 128.

Roux, Norcard, Annal. Inst. Pasteur 1. 19. (1887), S. 19.

Lebenslauf.

Ich wurde geboren am 10. August 1909 zu Münster als Sohn des Vermessungsrates Arnold Schlömer. Ostern 1930 bestand ich am Reformrealgymnasium zu Gronau i. Westf. die Reifeprüfung. Medizin studierte ich an den Universitäten Münster, Freiburg, Graz und Rostock. Im Wintersemester 1932/33 bestand ich an der Westfälischen Wilhelms - Universität das Physikum und am 12. Dezember 1936 das medizinische Staatsexamen. Meine Praktikantenzeit verbrachte ich an dem Hygienischen Institut (Dir. Prof. Dr. Jötten) und an der Medizinischen Universitätsklinik (Dir. Prof. Dr. Schilling) zu Münster.